维普资讯 http://www.cqvip.com

很重要，用VAC比VA化疗可使疾病得到更好缓解，提高生存率;VAC化疗还可使三—四期病人保持完全缓解的可能性增大[12]。

7 预后

预后与诊断时间、病理类型、临床分期、治疗是否及时及治疗方案是否恰当等因素有关。从病理分型看，多形型预后较好、胚胎型次之，腺泡型最差。年龄、性别不影响预后[13]。单纯眶内容挖出术，死亡率较高，生存率仅为30%，单纯放疗生存率为66%[17]。近年来采用三者联合治疗，2年生存率达85.7%[18]，3年生存率达89.93%[6,19]，5年生存率达66%[2]。预后与分期及治疗方案的关系很密切，IRS报道一期病人;A治疗组(VAC化疗)疾病缓解和生存率提高优于B治疗组(VAC+放疗)，二种治疗疾病5年缓解率近80%，A组病人5年生存率为93%，而B组为81%;二期病人C治疗组(VA+放疗)疗效优于D治疗组(VAC+放疗)，说明化疗中环磷酰胺作用不大，2种治疗组5年生存率为72%;三期病人5年生存率为52%，而四期病人5年生存率为20%[12]所以，需及早发现、及时综合治疗，才能有效提高患者生存率、改善患者生存质量。

参 考 文 献

1.上海第一医学院眼耳鼻喉科医院眼科 中华医学杂志 1974;1:45
2.梁克勤，等.中国实用眼科杂志 1989;7(7).406
3.Ellenbogen Elasky MA Am J Ophthalmol 1975;80:1024
4.Crist WM et al J.clin Oncol 1990;8:443
5.Shields JA Bakewell B Ophthalmology 1986;93:379
6.Shield JA Shield CL Int Ophthalmic Clin 1993;33(3):203
7.Howard Gm，Castern VG Arch Ophthalmol 1987;105:700
8.同济医科大学附属协和医院眼科 中国实用眼科杂志 1987;12:753
9.Harval BL et al AM J clin Path 1970;53:555
10.Shield JA et al.Arch Ophthalmol 1987;105:700
11.李秀伟，等.国外医学眼科分册 1989;4:249
12.Harold M et al Cancer 1988;61:209
13.Jaffe N et al Am.J Surg 1973;125:482
14.Sagerman RH et al Am J Roentgenol 1972;114:31
15.Daviel H et al Am J Ophthalmol 1994;118(6):808
16.CHESS J et al Int Ophthalmic Clin 1982;22(1):163
17.Ghafoor SyA，et al. Br J Ophthalmol 1985;69:557
18.Heyn RM et al Cancer 1974;34:2128
19.Beverly Raney et al Cancer 1987;60:2337

(收稿日期 1997－10－15)

卡氏肺孢子虫 分类 抗原差异 遗传基础
221-224
41

肺孢子虫分类学的研究进展

Ⅰ.虫株的抗原差异及遗传基础

R382.3

寄生虫学教研室 叶 彬 综述
传染病寄生虫病研究所 陈雅棠 审校

中图分类号 R382.3

卡氏肺孢子虫(Pneumocystis carinii，Pc)的分类地位一直存在争议，以往的研究认为它是原虫，然而80年代后的基因及基因表达产物分析又认

* 男，1963－08出生，副教授

维普资讯 http://www.cqvip.com

为是真菌[1]。

人及低等哺乳动物源的Pc在形态、超微结构、染色、组化特征等方面是相同的[2~6]。但在Pc抗原特异性、基因型方面不断地显示不同宿主来源Pc存在不同程度的差异，认为应根据不同宿主来源将Pc命名为不同种[6,7]。

在不同宿主源Pc能否相互感染的研究方面，发现SCID小鼠只能感染上小鼠源Pc，裸鼠只能感染上大鼠源Pc[8]，表明Pc存在宿主特异性。从流行病学角度看，肺孢子虫肺炎(Pneumocystis carinii Pneumonia，PCP)不是人兽共患病，似乎还没有一种动物是人类PCP的保虫宿主[8]。为了说明不同宿主感染的Pc在免疫学方面的多样性，本文就Pc的抗原差异及遗传基础作一综述报告。

1 卡氏肺孢子虫虫株的抗原差异

1.1 表面糖蛋白A/主要表面糖蛋白(MSG)

Pc的主要表面糖蛋白(MSG)是其虫体表面的一种具高度免疫原性的表面抗原分子，分子量为100－125kDa，也被称为P115或gP120[9,10]。MSG在Pc的病理学上非常重要，MSG与肺泡上皮及巨噬细胞的纤维连接蛋白(fibronectin)相互作用参与虫体附着[11,12]。以抗MSG单抗被动免疫动物可以部分阻止动物模型的PCP进程[13]。由于单抗MAb85－1－5E12能特异地结合该糖蛋白分子，故又被称为抗原5E12[14]。5E12抗原分子可存在于雪貂、大鼠、兔、人等宿主来源的Pc表面[14,15]。雪貂源Pc的5E12分子大小为115～120kDa、等电点为5.0～7.0，是Pc的主要蛋白，富含岩藻糖残基[16]，后来在人源及大鼠源Pc中也得到证实[9,17,18]。Gigliotti[14]以单抗MAb85－1－5E12与Pc的SDS－PAGE后进行的免疫印渍试验证明，使用相同的制备方法，不同宿主源Pc的该糖蛋白分子大小分别为，大鼠及雪貂源Pc:115～120kDa;小鼠源Pc:135或110－120kDa(依制备法而异);人源Pc:95kDa。尽管分子大小有差异，但这些糖蛋白分子具有一相同的抗原决定簇。

从同种而不同株宿主来的Pc的主要表面糖蛋白(MSG)仍然存在差异。Andrews等[19]用4株大鼠(Lewis株、Sprague－Dawley株、Brown Norway株、Long Evans株)经可的松诱导10周后取肺分离Pc、纯化到MSG。以4种抗MSG的单抗(RA－F1、RA－C7、RA－C11、RA－C6)为探针用免疫印渍方法检测不同分离株Pc的MSG。结果是RA－F1、RA－C7与4株大鼠源Pc的MSG有强烈反应，RA－C6、RA－C11反应不强但显示出对MSG的不同识别，RA－C11识别Lewis大鼠源Pc的MSG，RA.C6识别BrownNorway大鼠及Spragae. Dawley大鼠源Pc的MSG。

1.2 包囊可溶性抗原(CSA)

陈雅棠等将分离的包囊经超声粉碎、离心沉淀取上清液即得到包囊可溶性抗原(CSA)。CSA经SDS－PAGE和免疫印渍试验，分析其中各肽的分子量，结果显示20条以上区带，主带分子量为>100，85－94，67，52和34kDa。用抗人源Pc单抗MAb－$2G_2$及抗鼠源Pc单抗MAb－$2B_9$、MAb－$7C_4$与鼠源Pc的CSA进行识别反应，结果显示MAb－$2G_2$识别鼠源Pc的CSA的85kDa区带，而MAb－$2B_9$、MAb－$7C_4$识别58和40kDa区带，提示鼠源Pc的CSA中85kDa抗原可能与人源Pc抗原有交叉，可用于检测人血清的抗Pc抗体[20]。其他研究也显示不同宿主来源Pc的CSA谱带不同[21,22]。

1.3 抗原特性差异

对人源和大鼠源Pc的免疫印渍显示大鼠源Pc的主要抗原区带是116、50、45kDa，而人源Pc的抗原区带是116、92、66、40kDa[23]。

大鼠源Pc的166kDa带对蛋白酶(如胰蛋白酶)和糖水解酶(Zymolayase)敏感，但对其他酶(如酯酶)处理不敏感，能与麦芽凝集素强烈反应，表明有甘露糖、葡萄糖、N－乙酰葡萄糖胺残基存在。免疫荧光染色及表面标记显示116kDa抗原位于Pc胞壁。大鼠源Pc的45、50kDa带转印在硝酸纤维素膜进行上述降解反应的敏感性与116kDa带相同、但虫体上的该抗原却对此降解反应有抵抗，这两种抗原成分对Lectin结合很差，表面标记反应弱。

人源Pc的116kDa抗原带特性与大鼠源Pc的116kDa带相似。人源Pc的40kDa带的蛋白及碳水化合物成分与大鼠源Pc的45和50kDa带较接近。人源Pc的92kDa抗原带在酶处理及Lectin结合方面的特性类似116kDa带，66kDa带的酶处理结果

维普资讯 http://www.cqvip.com

则与40kDa带相似。

Graves等[21]发现大鼠源Pc的主要抗原是110～116.50.60kDa。蛋白酶及过碘酸钠染色证明这些抗原是糖蛋白。过碘酸钠处理可降低110kDa抗原的活性，破坏55～60kDa抗原活性，表明110kDa抗原的抗原活性来自碳水化合物，而55～60kDa抗原的主要成分则是碳水化合物。考马斯兰染色时，110kDa抗原显示明显，而55～60kDa抗原却不能显示，也证明110kDa所含蛋白相对较多，55～60KDA抗原的蛋白成分较少。PCP病人血清和PCP大鼠血清主要与110～116kDa、55～60kDa抗原发生反应，显示Pc抗原成分相对复杂。大鼠源和人源Pc可能具有共同抗原决定簇，但受Pc感染的人血清和大鼠血清对大鼠Pc的主要抗原成份有竞争效应。大鼠血清能比人血清识别更多的抗原表位。

2 抗原差异的遗传基础

MSG基因是重复的、高度多态性的，分布于所有14～15条染色体上。MSG基因的表达是由一个叫做上游保守序列(upstream conserved sequence，UCS)的DNA元件(element)来调控介导的[24]。UCS位于单个染色体上，行使各种MSG表达位点的功能。UCS不是高度重复的，但各种不同的MSG基因可附着于UCS上，表明MSG基因多样性是由UCS与MSG的重组造成的。UCS位点与MSG基因重组是通过错位交换(reciprocal exchange)或基因变换(gene conversion)实现的[24]，这种重组也许增加了MSG的种类，有利于Pc的繁殖，因为MSG多态性正是该虫抗原变异逃避宿主免疫系统的表现。

Wada等[25]以λgt11为表达载体构建鼠源Pc的MSG的cDNA，并用多克隆抗体进行筛选，实验中共选出47个阳性克隆。8个克隆具有同源的序列，分为4类，分别叫做MSG1、MSG2、MSG3、MSG4、其核苷酸序列85％～86％相同，氨基酸序列67％～70％相同。以EcoRI、BamHI、KpnI等核酸内切酶处理Pc基因组DNA，再与不同探针杂交则显示不同的谱型。比较发现MSG核苷酸序列产生的氨基酸序列与原肌球蛋白(tropomyosin)及肌球蛋白(myosin)有20～30％相同。原肌球蛋白与皮层肌动蛋白(cortical actin)细胞骨架一起调节细胞形态 粘附及运动，看来MSG与该系统相互作用将胞外信号转入胞内的膜细胞骨架，在Pc的增殖及定位中发挥作用。

Haidaris等[26,27]报告雪貂Pc的gpA(相当于MSG)的cDNA核苷酸序列及氨基酸序列与大鼠源Pc MSG1分别有57％、33％相同，结果也说明不同哺乳动物宿主源Pc的主要表面糖蛋白在结构及组成上是有多样性。

Gigliotti等[28]用雪貂源Pc的糖蛋白A(gPA)基因的引物(903－S和904－AS)、大鼠源Pc的45～55kDa抗原基因引物(Smu－S、Smu－AS)对感染雪貂、大鼠、小鼠、人肺的Pc分离株DNA 进行扩增。此二对引物都只能扩增与引物来源相同的宿主源Pc DNA。若以保守的Pc线粒体rRNA基因引物均能扩增上述几种动物源Pc样品的DNA。gPA基因的基因型变异用Southern印渍试验也得到证实。以雪貂源Pc特异的gPA cDNA为探针、对雪貂、小鼠、人、大鼠肺中的Pc基因组DNA杂交，结果只在Pc感染的雪貂肺中有杂交。

Wright等[29]对gPA基因编码区中富含半胱氨酸(Cys)的分析认为不同宿主来源Pc在这一区域是相同的(保守的)。他们以雪貂、大鼠源Pc的gPA基因富含Cys区域设计了两对引物，对雪貂源、大鼠源、SCID小鼠源Pc进行PCR扩增，均得到约300 bp扩增产物。以限制性内切酶PstI、BclI、HinfI对扩增产物进行消化、电泳产生不同电泳谱型，表明从各种宿主来的Pc的PCR扩增产物序列是不同的。尽管Pc gPA存在宿主源的差异，保守的Cys残基及邻近序列意味着gPA二级结构和功能在不同宿主来源Pc分离株是相似的。

在高严格度(high stringency)条件下，大鼠源Pc的gPA/MSG基因不能杂交人源Pc 的染色体[30]。这些结果表明大鼠源或雪貂源Pc的gPA/MSG基因与人源Pc的gPA/MSG基因差异也许甚大、而不能用DNA杂交或PCR方法来分离人源Pc的gPA/MSG基因。Stringer等[31] 成功地用另外的方法克隆出人源Pc的gPA/MSG基因。

维普资讯 http://www.cqvip.com

实验结果分离到两个人源Pc的gPA/MSG基因，分别命名为hMSG4(hgpA4)和hMSG12(hgpA12)。hMSG4与大鼠源、雪貂源Pc的gPA/MSG序列相同程度分别为46%、51%，但后二者彼此的相同程度为50%。hMSG4翻译成的多肽序列类似大鼠、雪貂源Pc的cDNA 所翻译成的gPA/MSG氨基酸序列，其相同程度分别为34%和30%，但后二者彼此的相同程度为33%。hMSG12的翻译缺乏一个读码框，但若在第95位碱基作读码框移动，则所编码的多肽与hMSG4有78%相同。hMSG4，hMSG12看来类似大鼠源Pc的16S rRNA基因差异所产生的"原型"及"变异型"。

3 结语

根据上述的研究报告可见人源与其他动物源Pc在免疫学方面表现出多种差异。以多克隆及单克隆抗体研究证实人源、大鼠源、小鼠源、雪貂源、兔源Pc的主要表面糖蛋白(MSG)、包囊可溶性抗原(CSA)在电泳图谱、分子大小、生化特性诸方面有着差异。不同宿主源Pc的MSG多样性的遗传基础在于MSG(gpA)基因的重复性及高度多态性。这是由MSG基因与UCS序列(上游保守序列)的错位交换或基因交换形成的，其生物学意义是有利于Pc繁殖，并逃避宿主免疫系统。

肺孢子虫虫株差异的研究可以弄清各种宿主肺孢子虫肺炎的病原差异程度，了解各株肺孢子虫的毒性大小。从流行病学角度，调查肺孢子虫是否在人与动物宿主间传播，判断肺孢子虫肺炎是否为真正意义上的人兽共患病，从而评价以动物源Pc建立的免疫学、分子生物学检验方法及筛选的药物用在人源Pc的准确性。

参考文献

1.张 怿，等.中国寄生虫学与寄生虫病杂志 1997;15(1):45
2.Barton EG, et al. AM J Pathol 1969;54:209
3.Campbell WG. Arch Pathol 1972;93:312
4.Hasleton PS, et al. J Clin Pathol 1981;34:1138
5.Matsumoto Y, et al Parasitol Today 1986;5:137
6.Frenkel JK. Nat Cancer Inst Monogr 1976;43:13
7.Hughes WT, et al. J Infect Dis 1988;157:432
8.Aliouat EM, et al. J Euk Microbiol 1994;41(5):71S
9.Radding JA, et al. Infect & Immun 1989;57:2149
10.Tanabe K, et al. Infect & Immun 1989;57:1363
11.Pottratz ST, et al. J Clin Inves 1990;86:1678
12.Pottratz ST, et al. J Clin Invest 1991;88:403
13.Gigliotli F, et al. J Clin Invest 1988;81:1666
14.Gigliotti F. J Infect Dis 1992;165:329
15.Gigliotti F, et al. J Infect Dis 1986;154:315
16.Gigliotti F, et al. J Infect Dis 1988;158:848
17.Lundgren B, et al. J Clin Invest 1991;87:163
18.Tanabe K, et al. J Infect Dis 1988;157:593
19.Andrews RP, et al. J Euk Microbiol 1994;41(5):72S
20.陈雅棠，等.中国寄生虫学与寄生虫病杂志 1994;12(2):115
21.Graves DC, et al. Infect & Immun 1986;54:96
22.Walzer PD, et al. J Immunol 1987;138:2257
23.Linke MJ, et al. Infect & Immun 1989;57:1547
24.Wada M, et al. J Euk Microbiol 1996;43:8S
25.Wada M, et al. J Infect Dis 1993;168:979
26.Haidaris PJ, et al. J Infect Dis 1992;166:1113
27.Kovacs JA, et al. J Biol Chem 1993;268:6034
28.Gigliotli F, et al. J Infect Dis 1993;168:191
29.Wright TW, et al. Infect & Immun 1994;62:1513
30.Stringer JR, et al. J Euk Microbiol 1993;40:733
31.Stringer SL, et al. J Euk Microbiol 1993;40:821

(收稿日期 1997－11－05)